

## ゲノムリニューアル法によるワイン酵母の育種及び醸造特性

小澤麻由美\*、中沢伸重\*\*、櫻井 廣\*

県内で多く使用されているワイン酵母EC-1118からゲノムリニューアル法<sup>1)</sup>により硫化水素非生産菌株を5株育成した。これらの酵母をYPD20液体培地ならびにリースリング種ブドウ果汁により生育、発酵試験を行い、醸造特性を明らかにしたところ、硫化水素非生産性の他に親株と異なった性質をもっていることがわかった。官能検査の結果から、ボディがあり、味のバランスのいいものや、香りに特徴がある酵母を育種できることがわかり、数株は岩手県の優良ワイン酵母となり得ることが示唆された。

キーワード：ゲノムリニューアル法、ワイン酵母、硫化水素低生産性

## Breeding and Enological Characteristics of New Wine Yeast with Genome Renewal from *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118

OZAWA Mayumi, NAKAZAWA Nobushige and SAKURAI Hiroshi

Five yeast strains, which had less production of hydrogen sulfide, were bred from *Saccharomyces cerevisiae* EC-1118 with genome renewal method. These five strains were investigated by growth tests in YPD and laboratory-scale fermentation tests in Riesling-lion grape must. As a result, new strains had less production of hydrogen sulfide besides different character from parent strain EC-1118. Wines were fermented at 18 °C for 7 to 13 days. The wine produced were evaluated by a sensory test. The results of this evaluation show that some wines are rich in body and have well balanced, and some are appraised at high quality. On the basis of these results, it is suggested that some clones of yeast are suitable for wine brewing in Iwate prefecture.

**key words** : genome renewal, wine yeast, less production of hydrogen sulfide

### 1 緒 言

ワインの酒質は原料となるブドウの品種・品質に大きく左右され、酒質向上の研究もブドウの品種、栽培技術の改良や、果汁の前処理、ワインの精製などの製造プロセスの改良がほとんどで、主発酵を担うワイン酵母のワイン品質への影響は過小評価される傾向にあった。

しかし近年、ワイン酵母が種々のエステル<sup>2)</sup>、高級アルコール<sup>3)</sup>などの生成やブドウ果汁中のモノテルペン類の代謝を通じてワインのブーケ、アロマの形成に、また、グリセリン<sup>4)</sup>、2,3ブタンジオール<sup>5)</sup>などの生成、フェノール類の合成、分解、酵母菌体からのアミノ酸の溶出などを通じて、ワインの味の形成に重要な役割を果たし

ていることが解ってきた。また、これらの物質の生成及び分解能がワイン酵母菌株間で大きく異なっている<sup>3-6)</sup>ことが次第に明らかになるにつれて、ワイン醸造におけるワイン酵母の重要性が見直されるようになってきた。ワイン酵母の選択は古くから行われていたが、原料ブドウ由来の野生酵母群存在下での開放発酵であることから、酵母選択の基準は官能的に良質、無難なワインが得られることを前提に、発酵力、発酵温度、亜硫酸耐性その他主に安全、安定な発酵の進行を目安にしたスクリーニングしか行われなかった。しかし、細胞融合法や遺伝子操作の発達とともに、ワイン酵母の遺伝的改良の可能性が指摘されるようになってきた<sup>7)</sup>。

\* 醸造技術部

\*\* (財)岩手生物工学研究センター

現在、県内で主に使用されているワイン酵母 EC-1118 は、ワインの香味に悪影響を及ぼす硫化水素を生成するため、硫化水素低生産酵母菌株が望まれる。著者らは劣性優良遺伝子のホモ型化による形質発現に基づく酵母の育種すなわち酵母に胞子を形成させ、マイクロマニピレーターで胞子を分離し、ワイン酵母の生活環であるホモタリックにより染色体を倍化させ、減数分裂により染色体が組み換えられた株の取得が期待されるゲノムリニューアル法<sup>1)</sup>により EC-1118 から硫化水素生成能の低い株を数株取得した。本報告は分離株でワイン試験醸造を行い、発酵、香气生成ならびに有機酸生成等の醸造特性を明らかにし、これら菌株のワイン酵母としての有用性について検討した結果について報告する。

## 2 実験方法

### 2-1 供試菌株

IME1 遺伝子と G418 耐性を付与する遺伝子を乗せた多コピー型プラスミド pIGZ2 を構築し、このプラスミドを EC-1118 株に導入した。ジェネティシン耐性を選択マーカーとして得られた形質転換体を胞子形成培地に移し、胞子形成後、マイクロマニピレーターで胞子を分離した。取得した細胞を BIGGY 培地(DIFCO)により硫化水素の生成度合を判定した。得られた11株(表1)のうち硫化水素の生成量が少なかった5株を各試験に用いた。なお、対照として EC-1118、W-3、OC-2 を使用した。

表 1 EC-1118 株から得られた減数分裂分離体株

菌株	硫化水素生成
EC-1118	++
1-A	-
1-B	++
2-A	-
2-B	-
3-A	+
3-B	+
4-A	+
4-B	+
5-A	-
6-A	+
7-A	-
W-3	++
OC-2	++

### 2-2 増殖曲線作製

YPD 培地 (3ml) で前培養 (25℃、2日間静置) した菌体を  $1 \times 10^5$  cells/ml になるよう、YPD 培地 10ml (L 型試

験管) に接種し、25℃ で静置培養した。培地の比濁度 (Klettunitsat 660nm) を所定時間毎に Klett 型光電比色計 (伊藤超短波製) で測定し、菌体濃度の経時変化を調べた。供試菌株の増殖力は増殖曲線のピーク、すなわち、最高増殖菌体濃度をもって示した。

### 2-3 亜硫酸耐性試験

100ppm の亜硫酸を添加したブドウ果汁を用いて HAR-A<sup>2)</sup> の方法に従った。

### 2-4 発酵試験

YPD 培地 (3ml) で前培養 (25℃、2日間静置) した菌体を  $1 \times 10^6$  cells/ml になるよう、YPD20 (グルコース 20% 含有 YPD 培地) 培地 50ml (200ml 容三角フラスコ) に接種し、18℃ で静置培養した。MEISSEL の重量法<sup>3)</sup> により経時的に炭酸ガス放出量を測定した。

### 2-5 小規模ワイン醸造試験

常法により、最終的な亜硫酸量が 50ppm になるようにピロ亜硫酸カリウムを添加しながら、破碎、压榨して得たリースリング・リオン種ブドウ果汁 (搾汁率 60v/w%) の糖度が 23 度になるようグルコースで調整した後、10ℓ 容ステンレス製発酵容器に 5ℓ ずつ分注し、16 時間放置した。これに各供試酵母菌株の前培養液を 5v/v% 添加し、室温で発酵させた。なお、前培養には 121℃、15 分間加圧殺菌したブドウ果汁を用い、各菌株を接種して 25℃ で 3 日間静置培養した。

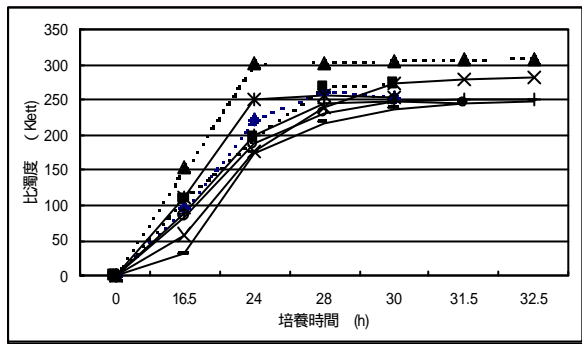
### 2-6 分析方法

分析は常法<sup>10)11)</sup> により、比重は浮ひょう計を用い、エキス分は比重より計算法で求めた。アルコール濃度はガスクロマトグラフ分析法 (HEWLETT PACKARD 5890 SERIES、カラム充填剤 PEG1000) で、pH はガラス電極 pH メーター (HORIBA pH meter F-22) で測定した。総酸度は OIV の分析法に従い NaOH による滴定値を酒石酸に換算した。直糖はソモギーネルソン法で、グリセロール及び還元糖は Waters 製液体クロマトグラフィー (糖分析用カラム Sugar-PakH) を用いて測定した。有機酸はキャピラリー電気泳動で測定した。低沸点香气成分は HewlettPackard ガスクロマトグラフィーを用いて SHINOHARA らの方法<sup>12)</sup> に従って直接導入法で行った。

ゲノムリニューアル法によるワイン酵母の育種及び醸造適性

3 実験結果

3-1 菌体増殖力



D培地におけるワイン酵母の増殖曲線

... W-3 ... OC-2 ... EC-1118 - x - 1-A  
 - \* - 2-A - - 2-B - + - 5-A - - - 7-A

25、YPD培地における菌体濃度の経時変化を図1に示した。親株のEC-1118が327KUであったのに対し、1-Aは293KU、2-Aは257KU、2-Bは248KU、5-Aは270KU、7-Aは259KUといずれも増殖力が低下した。しかし、対照株のW-3(63KU)やOC-2(272KU)と同等の増殖力を示した。1-Aと7-Aの増殖の立ち上がりが遅かった。

3-2 亜硫酸耐性

表2 EC-1118株から得られた減数分裂分離体株の亜硫酸耐性

菌株	亜硫酸耐性
W-3	+
OC-2	+
EC-1118	++
1-A	+(±)
2-A	++
2-B	+(±)
5-A	+
7-A	+(±)

表3 発酵終了液の成分分析

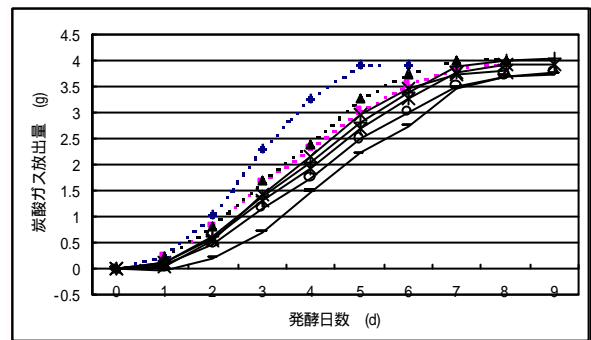
	Brix	エタノール	直接還元糖	pH	総酸度	リン酸	クエン酸	酢酸	グリセロール	アセトアルデヒド	酢酸エチル	酢酸イソアミルエステル	高級アルコール	
	(°)	(%)	(g/100ml)		(g/100ml)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	
W-3	7.0	8.54	6.79	4.76	0.18	0.18	0.25	0.02	3.48	14.26	22.78	3.30	27.28	153.81
OC-2	7.4	8.34	7.55	4.71	0.18	0.21	0.24	0.28	4.24	20.06	17.20	1.76	19.97	147.50
EC-1118	7.3	8.05	6.70	4.59	0.17	-	0.19	-	3.16	7.87	36.28	2.07	39.74	107.66
1-A	7.0	7.49	6.50	4.72	0.16	0.09	0.22	0.02	4.10	12.30	28.91	2.67	32.76	160.29
2-A	7.5	8.42	6.17	4.64	0.20	0.06	0.27	0.01	5.88	14.70	35.69	3.06	39.59	152.39
2-B	7.6	8.63	6.81	4.81	0.15	0.10	0.29	0.52	4.19	10.07	32.38	2.06	35.43	177.40
5-A	7.8	8.76	6.94	4.78	0.15	0.09	0.24	0.50	3.65	8.11	37.36	3.70	41.92	147.98
7-A	7.4	8.45	6.23	4.62	0.20	0.09	0.25	0.03	6.05	13.67	43.32	2.00	46.04	118.03

図  
1  
2  
5  
Y  
P

100ppmの総亜硫酸を含むブドウ果汁10mlを用いて亜硫酸耐性試験の結果(表2)2-AはEC-1118と同等の亜硫酸耐性でW-3より強い耐性を示した。5-AはW-3と同等の耐性を示したが親株よりやや弱かった。一方、1-A、2-B、7-Aは亜硫酸耐性がW-3よりやや弱く数時間遅れて発酵した。

3-3 発酵試験

YPD20液体培地50mlを用いた18の発酵試験結果を図2に示した。1-A、2-A、5-Aの発酵は親株EC-1118と同等であったが、2-B、7-Aの発酵は緩慢であった。発酵終了時の発酵液の成分分析を表3に示した。2-A、2-B、



D20液体培地における発酵試験

... W-3 ... OC-2 ... EC-1118 - x - 1-A  
 - \* - 2-A - - 2-B - + - 5-A - - - 7-A

5-A、7-Aのエタノール生成量は8.4~8.8%の範囲にあり、親株に比べ0.4~0.8%高い値であった。しかし、1-Aは7.49%とアルコール生成能がやや低かった。2-B、5-Aは低生酸性であり、2-A、7-Aは高生酸性であった。減数分裂分離体はいずれも親株よりグリセロール生成量が多く、特に7-Aは親株の約2倍量生成した。また、高級アルコールやエステルの生産性も親株より優れていた。

図  
2  
1  
8  
Y  
P

表4 ワインの一般成分分析

	比重	エタノール (%)	直接還元糖 (g/100ml)	pH	総酸度 (g/100ml)	酒石酸 (g/l)	リン酸 (g/l)	クエン酸 (g/l)	酢酸 (g/l)	グリセロール (ppm)	アセチルアセチド (ppm)	酢酸エチル (ppm)	酢酸イソアミルエステル (ppm)	高級アルコール (ppm)	
果汁	1.076	-	17.15	3.15	1.07	4.49	10.77	-	-	-	-	-	-	-	
W-3	1.004	11.1	2.10	3.12	1.04	3.71	5.91	1.08	0.20	5.50	4.46	65.64	6.98	74.26	249.42
EC-1118	1.010	11.2	3.22	3.11	1.08	3.98	6.31	0.87	0.23	5.79	2.06	58.34	6.41	66.68	249.31
1-A	1.008	11.4	3.00	3.11	1.12	3.98	6.61	0.73	0.20	6.57	3.06	51.69	3.58	57.01	239.43
2-A	1.012	11.3	3.76	3.08	1.14	3.98	6.42	1.12	0.09	7.67	4.13	60.92	4.89	67.47	172.67
2-B	1.010	11.3	3.17	3.16	0.99	3.60	6.07	1.14	0.25	5.16	3.55	46.19	1.16	48.35	292.29
5-A	1.014	10.8	4.40	3.14	1.05	3.86	6.20	0.90	0.16	5.67	3.36	49.12	0.90	51.09	220.67
7-A	1.008	11.4	3.04	3.11	1.10	3.59	6.74	0.87	0	6.91	9.39	50.84	1.00	53.14	281.67

3-4 小規模ワイン醸造試験

ワイン酵母 EC-1118由来の硫化水素低生産性株についてのワイン醸造特性を検討するため、リースリング種ブドウ果汁5ℓを用いて小規模試験醸造を実施した。なお比較対照にはW-3及びEC-1118を用いた。発酵経過を図3に、また生成ワインの一般分析値を表4に示した。

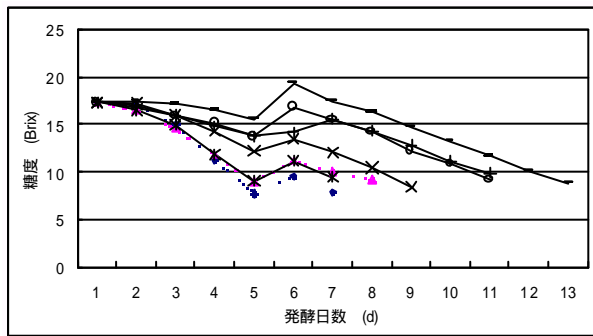


図3 発酵経過

... W-3 ... OC-2 ... EC-1118 - x - 1-A  
 - \* - 2-A - - 2-B - + - 5-A - - - 7-A

2-A及び1-Aの発酵は、発酵日数がそれぞれ7日、9日であり、対照のW-3の7日、EC-1118の8日に対してほぼ同等の発酵力を示した。一方、2-Bや5-A、特に7-Aは発酵日数がそれぞれ11日、13日と対照に対して長く発酵が緩慢であった。発酵終了時のエタノール生成量は5-Aが親株に比べ0.4%少ない値であった他は、親株とほぼ同量生成した。総酸度は2-B、5-Aが親株に比較して減少する傾向が認められたが、1-A、2-A、7-Aは同程度もしくは増加傾向にあった。有機酸分析の結果、2-Bは親株に比べリンゴ酸含量が少なく、1-A、7-Aは多かった。酢酸含量は2-A、7-Aが少なかった。1-A、2-A、7-Aは高グリセロール生成株であった。生成ワインの香気成分でn-プロピル、イソブチル及びイソアミルアルコールの和

で表した高級アルコールの含量は2-B、7-Aが親株より増加していたが、エステルは減少していた。

上槽6ヶ月後に官能検査を実施した結果、親株に比べ1-Aと2-Aは後味に甘みの丸さと酸味に特徴があった。2-Bは香りが良く、酸が穏やかであった。5-Aは発酵不足の感があり、7-Aは香りが良くまとまりもよかった。

4 考察

硫化水素低生産性ビール酵母の育種に硫化水素生成抑制遺伝子 *NHS5* を導入した報告<sup>13)</sup>がある。今回我々はゲノムリニューアル法<sup>1)</sup>により分離した胞子を硫化水素非生産性を指標として選抜を行い、硫化水素を生産しない酵母1-A、2-A、2-B、5-A、7-Aを造成することができた。これらの酵母は様々な発酵特性を示した。

25 YPD培地における増殖力はいずれの試験酵母も親株EC-1118より劣っていた。しかし実用株のW-3やOC-2と同等の発酵力を示したので実用化の上で問題はないと思われた。

100ppmの亜硫酸を添加したブドウ果汁の発酵開始時間にばらつきが見られたがいずれも40時間以内に発酵を始めた。また、試験酵母は亜硫酸200mg/l添加果汁でも発酵することができたのでOC-2以上の亜硫酸耐性があると考えられる。

18における発酵速度はYPD20とブドウ果汁では同様の結果を得ることができ、2-B、5-A、7-Aが遅かった。しかし、発酵速度は発酵温度と関係があり、温度によりワイン酵母の発酵型が分けられる<sup>14)</sup>。ワイン酵母はW-3のような低温発酵型の酵母と、OC-2のような中温発酵型の酵母、さらに、低温、中温両温度でもに発酵良好な酵母に分けられる。本試験では発酵速度の試験温度は18であり、低温と中温の間の温度であった。そのため、本試験で発酵速度が遅くても、どちらかの温度に発酵温度を変えて試験すれば発酵性が良くなる可能性があるた

## ゲノムリニューアル法によるワイン酵母の育種及び醸造適性

め、安易に優良ワイン酵母の選抜から削除すべきではない。供試菌株がどの発酵型を示すか今後の検討を要する。

オフ・フレーバーである硫化水素を生産しない酵母であったが、試醸ワインの官能からはその特性をうかがうことができなかった。しかし、芳香成分生成能、特に高級アルコールの生産性に差が見られ、これは官能においてもはっきりとした違いに感じることができた。この芳香成分の生成にも発酵温度が関係するので、発酵温度を変えて検討する必要がある。

グリセロールの生産性は菌株によりかなり異なる<sup>15)</sup>ことが知られており、今回供試した菌株のうち2-A、7-Aのグリセロール生成量が多く、官能的に酒の厚みとして感じられた。

酸度の著しく高いワインの生物学的減酸方法に乳酸菌によるマロラクティック発酵がある。他方、種々のワイン醸造関連酵母もリンゴ酸を分解する<sup>16-20)</sup>。*Schiz. pombe*は発酵中、リンゴ酸をほぼ完全に分解し、酸度を減少させる。一般ワイン酵母は発酵中、リンゴ酸を約10~35%分解するが、コハク酸や乳酸などを発酵副産物として生成するので、全体としての減酸はほとんどない。しかし、供試酵母のうち2-Bは著しくリンゴ酸分解能が高かった(約40%)ため、低生酸性酵母であった。本県のブドウのように酸度の高いブドウ果汁が仕込みに供される場合には、低生酸性の酵母の使用が望まれるので、2-Bは本県の優良ワイン酵母として有望である。逆に、1-A、2-A、7-Aはリンゴ酸分解能が低く、高生酸性酵母であった。これらは、酸が少ない果汁を発酵させるのに有望である。

### 5 結 語

県内で多く使用されているワイン酵母 EC-1118をゲノムリニューアル法により硫化水素非生産菌株を5株育成し

た。これらの酵母を YPD20液体培地ならびにリースリング種ブドウ果汁による生育、発酵試験を行った結果、親株と異なった性質が現れた。

1-A、2-Aは親株と同様の発酵経過を示したが、生酸性、グリセロール生成量が多かった。

2-Bは低酸性で高級アルコール含量が多かった。

5-Aは発酵が不良であった。

7-Aは高級アルコール、グリセロール含量が多かった。

### 文 献

- 1) R. MORTIMER : Yeast, 10, 1543 ( 1994 )
- 2) 大塚謙一 : 醸協, 70, ( 11 ) 800 ( 1975 )
- 3) 篠原隆 : 濃化, 52, 309 ( 1978 )
- 4) 乙黒親男 : 醸協, 78, ( 3 ) 214 ( 1983 )
- 5) 宇井定春 : 醸協, 72, ( 6 ) 449 ( 1977 )
- 6) C. D. DAUDT : Am. J. Enol. Vitic. , 24, 130 ( 1973 )
- 7) R. SNOW : Yeast Genetics, 439 ( 1983 )
- 8) S. HARA : Am. J. Enol. Vitic. , 31, 28 ( 1980 )
- 9) 東京大学農学部農芸化学教室編 : 実験農芸化学下巻, 第3版, 281, 朝倉書店 ( 1978 )
- 10) 注解編集委員会編 : 国税庁所定分析法注解
- 11) M. A. Amerine and C. S. Ough : Wine and must analysis
- 12) T. SHINOHARA : Agric. Biol. Chem. , 40, 2475 ( 1976 )
- 13) H. Twzuka : J. Am. Soc. Brew. Chem. , 50, 130 ( 1992 )
- 14) 押田明成 : 醸協, 90, ( 5 ) 381 ( 1995 )
- 15) B. C. RANKINE : Am. J. Enol. Vitic. , 22, 6 ( 1971 )
- 16) B. C. RANKINE : J. Sci. Fd. Agric. , 17, 312 ( 1966 )
- 17) 野々村英夫 : 醸協, 63, ( 7 ) 765 ( 1968 )
- 18) E. FUCK : Zbl. Bact. Abt. . 129, 82 ( 1974 )
- 19) 後藤昭二 : 酵工, 56, 133 ( 1978 )
- 20) K. WENZEL : Wein-wiss. 37, 133 ( 1982 )